

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-111593
(43)Date of publication of application : 15.04.2003

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/50

(21)Application number : 2001-309184 (71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP
(22)Date of filing : 04.10.2001 (72)Inventor : TAKEDA MAKOTO
TAKEDA KAZUYOSHI

(54) NEW PRIMER SET FOR DETECTING NUCLEIC ACID MARKER DERIVED FROM CHROMOSOME OF BARLEY ON WHEAT BACKGROUND AND UTILIZATION THEREOF

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide new primer sets for detecting a nucleic acid marker derived from a chromosome of barley on a wheat background, and to provide a method for utilizing the same.
SOLUTION: The new primer sets are obtained by originally designing primer sets for six nucleic markers positioned on a long arm of 1H chromosome of the barley and screening such primer sets as exhibiting difference (polymorphism) in amplification result between a case in which a genome DNA of the barley is used as a template and another case in which a genome DNA of the wheat is used as the template. Each of the obtained new primer sets comprising six sets is useful for deciding whether the 1H chromosome of the barley is introduced into the wheat or not. Further, some of the primer sets are useful for judging whether a hybrid progeny between the wheat and the barley has fertility or not.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.09.2004
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-111593

(P2003-111593A)

(43) 公開日 平成15年4月15日 (2003. 4. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2001-309184(P2001-309184)

(22) 出願日 平成13年10月4日(2001. 10. 4)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 武田 真

香川県木田郡三木町池戸2393

(72) 発明者 武田 和義

岡山県倉敷市中央二丁目20-1

(74) 代理人 100080034

弁理士 原 謙三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オオムギ染色体由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出するための新規なプライマーセット、およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 オオムギ染色体由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出するための新規なプライマーセット、およびその利用方法を提供する。

【解決手段】 オオムギの1H染色体長腕上に位置する6つの核酸マーカーについてプライマーセットを独自に設計し、コムギのゲノムDNAを鋳型にした場合と、オオムギのゲノムDNAを鋳型にした場合とで、増幅結果に相違(多型)が見られるプライマーセットをスクリーニングした。ここで得られた6つの新規プライマーセットはいずれも、オオムギの1H染色体がコムギに導入されているか否かを判定する際に使用可能である。また、これらプライマーセットの一部は、コムギ×オオムギ雑種後代における稔性の有無を判別する際に使用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】下記 (a) ないし (c) の何れか一つに示される、オオムギの 1 H 染色体長腕由来の核酸マーカをコムギの背景で検出するための新規プライマーセット。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット、

(b) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット、

(c) 配列番号 5 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 6 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット。

【請求項 2】下記 (d) に示される、オオムギの 1 H 染色体長腕由来の核酸マーカをコムギの背景で検出するための新規プライマーセット。

(d) 配列番号 7 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット。

【請求項 3】下記 (e) に示される、オオムギの 1 H 染色体長腕由来の核酸マーカをコムギの背景で検出するための新規プライマーセット。

(e) 配列番号 9 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 10 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット。

【請求項 4】下記 (f) に示される、オオムギの 1 H 染色体長腕由来の核酸マーカをコムギの背景で検出するための新規プライマーセット。

(f) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 12 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット。

【請求項 5】請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載のプライマーセットにより増幅される、コムギの背景で検出が可能なオオムギの 1 H 染色体長腕由来の核酸マーカ。

【請求項 6】オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギから取得した DNA を鋳型とし、請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載のプライマーセットを用いて増幅反応を行い、当該オオムギの 1 H 染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、当該 1 H 染色体長腕が上記コムギに実際に導入されているか否かを判定する判定方法。

【請求項 7】オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギから取得した DNA を鋳型とし、請求項 2 ないし 4 の何れか一項に記載のプライマーセットを用いて増幅反応を行い、当該オオムギの 1 H 染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、上記コムギの稔性の有無を判定する稔性判定方法。

【請求項 8】請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載のプ

ライマーセットを含んでなり、オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギにおいて、当該オオムギの 1 H 染色体長腕が導入されているか否かを判定するための、染色体導入の判定用キット。

【請求項 9】請求項 2 ないし 4 の何れか一項に記載のプライマーセットを含んでなり、オオムギ染色体の少なくとも一部が導入されたコムギの稔性の有無を判定するための稔性判定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、オオムギ染色体（特に、1 H 染色体長腕）由来の核酸マーカを、コムギの背景で検出するための新規なプライマーセット、およびその利用方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】コムギとオオムギとの属間交雑は、有用遺伝子をコムギに導入する有力な方法の一つである。特に、近年、交雑法の改良や交雑成功率の高い遺伝子型の発見により、オオムギは、コムギの品種改良用の遺伝資源としてより一層注目されるようになった。

【0003】重要な穀物でもあるオオムギのゲノム研究は世界的規模で進められており、これにあわせてオオムギ染色体上にある核酸マーカの研究も盛んに行われている。例えば、最近の研究では、Kunzelらが、マイクロダイセクションで単離したオオムギ転座染色体と特異的 STS (sequence tagged site) プライマーとを用いる PCR (polymerase chain reaction) により、Igri×Franka の RFLP (restriction fragment length polymorphism) 地図に転座点や核酸マーカの情報を統合した細胞遺伝学地図を作成している (Genetics, 154: p397-412, 2000)。

【0004】オオムギ染色体上に位置づけられた核酸マーカは、当該染色体上にある遺伝子のマッピングに有用である。加えて、オオムギを遺伝資源として用いるコムギの品種改良において、有用遺伝子導入の成否を判定する目的等にも利用できる可能性がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、オオムギ染色体由来の核酸マーカの全てが、コムギの背景 (genetic background: 遺伝的背景と同義) でもそのまま使用できるとは限らない。それは、オオムギとコムギとが同じコムギ連に属する近縁植物であるため、コムギのゲノム DNA の影響を受け易いからである。例えば、核酸マーカが PCR (Polymerase Chain Reaction) マーカである場合、コムギのゲノム DNA およびオオムギのゲノム DNA を鋳型とし、同一のプライマーセットを用いて増幅反応を行えば、両者間でほぼ同サイズの増幅産物が得られることがしばしばある。このような現象はオオムギとコムギとの間で PCR 増幅の結果に多型をもたらさないので、オオムギ由来の上記核酸マーカをコムギの背

景で検出することができなくなる。特に、コムギの中でも4倍体、6倍体コムギは、オオムギと比較してゲノムサイズが著しく大きいため、このような現象が起こる可能性がより高くなる。

【0006】そのため、オオムギ染色体（特に有用遺伝子が座乗する遺伝子座）をコムギに効率よく導入するためには、コムギの背景で検出可能なオオムギ染色体由来の核酸マーカー、および当該マーカーを検出するための新規なプライマーセットの開発が不可欠である。また、この核酸マーカーをオオムギ内で検出するためのプライマーセットが公知である場合でも、当該マーカーをコムギの背景で検出するためには、新規なプライマーセットを設計する必要が生じる。

【0007】本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、オオムギの遺伝子を用いたコムギの品種改良などに利用が可能な新規なプライマーセット、当該プライマーセットにより増幅される核酸マーカー、およびその利用方法などを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本願発明者は、オオムギ染色体（特に、1H染色体長腕）由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出するための新規なプライマーセットについて鋭意検討した。その結果、コムギのゲノムDNAを鋳型とする場合と、オオムギのゲノムDNAを鋳型とする場合とで、増幅結果に有意な多型が認められる複数の新規なプライマーセットを見出した。さらに、これら新規なプライマーセットの中に、コムギの背景において不稔をもたらす因子（以下、不稔因子または不稔遺伝子と称する）と連鎖した核酸マーカーを増幅するものを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】即ち、本発明に係る新規プライマーセットは、上記の課題を解決するために、下記（a）ないし

（c）の何れか一つに示される、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するためのプライマーセットであることを特徴としている。

（a）配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号2に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットAと称する）、（b）配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号4に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットBと称する）、（c）配列番号5に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットCと称する）。

【0010】また、本発明に係る他の新規プライマーセットは、上記の課題を解決するために、下記（d）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットであ

ることを特徴としている。（d）配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットDと称する）。

【0011】本発明に係るさらに他の新規プライマーセットは、上記の課題を解決するために、下記（e）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットであることを特徴としている。（e）配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットEと称する）。

【0012】本発明に係るさらに他の新規プライマーセットは、上記の課題を解決するために、下記（f）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットであることを特徴としている。（f）配列番号11に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号12に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセット（プライマーセットFと称する）。

【0013】上記のプライマーセット（A）～（F）の何れかを用いたPCRを行えば、オオムギのゲノムDNAを鋳型とした場合と、コムギのゲノムDNAを鋳型とした場合とで増幅結果に有意な多型が認められる。また、後述するが、これらプライマーセット（A）～（F）はいずれも、オオムギの1H染色体長腕の特定領域に位置づけられた核酸マーカーを増幅することが判明している。

【0014】よって、上記新規なプライマーセット

（A）～（F）はいずれも、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出する目的で 사용할ことができ、より具体的には、例えば、当該1H染色体長腕の特定領域（特定の遺伝子座）がコムギの細胞内に導入されているか否かを効率的に判定することが可能となる。

【0015】特に、プライマーセット（D）～（F）は、上記1H染色体長腕にある不稔因子（コムギ背景でのみ作用）と連鎖した核酸マーカーを増幅することが判明しているので、オオムギ染色体の導入が試みられたコムギを対象として、その稔性の有無を判定することが可能となる。

【0016】本発明に係る核酸マーカーは、上記の課題を解決するために、上記何れかの新規プライマーセット（A）～（F）により増幅される、コムギの背景で検出が可能なオオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーであることを特徴としている。

【0017】本発明に係る染色体導入の成否判定方法は、上記の課題を解決するために、オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギから取得したDNAを鋳型とし、上記何れかのプライマーセット（A）

10

20

30

40

50

～(F)を用いて増幅反応を行い、当該オオムギの1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、当該1H染色体長腕が上記コムギに実際に導入されているか否かを判定することを特徴としている。

【0018】本発明に係るコムギの稔性判定方法は、上記の課題を解決するために、オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギから取得したDNAを鋳型とし、上記何れかのプライマーセット(D)～

(F)を用いて増幅反応を行い、当該オオムギの1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、上記コムギの稔性の有無を判定することを特徴としている。

【0019】本発明に係る染色体導入の成否の判定用キットは、上記の課題を解決するために、上記何れかのプライマーセット(A)～(F)を含んでなり、オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギにおいて、当該オオムギの1H染色体長腕が導入されているか否かを判定するためのキットであることを特徴としている。

【0020】本発明に係るコムギの稔性判定用キットは、上記の課題を解決するために、上記何れかのプライマーセット(D)～(F)を含んでなり、オオムギ染色体の少なくとも一部が導入されたコムギの稔性の有無を判定するためのキットであることを特徴としている。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、図1～図12を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明は、特にこの記載に限定されるものではない。

【0022】1. 本発明に係るプライマーセット(A)～(F)

本発明に係るプライマーセット(A)～(F)はいずれも、オオムギ(学名: *Hordeum vulgare*)のゲノムDNAを鋳型としたPCRに供されると、オオムギ1H染色体(以下、単に1H染色体と称する)長腕の特定領域内に位置づけられた核酸マーカー(ここでは、PCRマーカーと同義)に特異的なPCR増幅産物を産生する、新規なPCRプライマーセットである。加えて、オオムギのゲノムDNAを鋳型とした場合と、コムギのゲノムDNAを鋳型とした場合とでPCR増幅結果に有意な多型が認められる、いわば、1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規なPCRプライマーセットである。

【0023】よって、上記新規なプライマーセット

(A)～(F)はいずれも、1H染色体長腕由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出する目的で使用することができ、より具体的には、例えば、当該1H染色体長腕の特定領域(特定の遺伝子座)がコムギの細胞内に導入されているか否かを、効率的に判定することが可能となる。特に、プライマーセット(D)～(F)は、1H染色体長腕にある不稔因子(コムギ背景でのみ作用)と

連鎖した核酸マーカーを増幅することが判明しているので、オオムギ染色体の導入が試みられたコムギを対象として、その稔性の有無を判定することが可能となる。

【0024】以下、新規なプライマーセット(A)～(F)について、その構成(塩基配列)、および、増幅対象となる1H染色体上の核酸マーカー、などを順に説明する。

【0025】プライマーセット(A)は、配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号2に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット(A)は、オオムギゲノム上の核酸マーカーGlb1(Wo 1fら: Mol. Gen. Genet. 234, p33-42, 1992)が座乗する遺伝子座の一部(本発明にかかる核酸マーカー(A))を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約900bpの増幅産物(核酸マーカー(A))を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは増幅産物を全く生じさせない。なお、図1～図3は、核酸マーカーGlb1周辺のゲノムDNA塩基配列を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット(A)に相当し、この2領域を両端とする連続した二本鎖ポリヌクレオチド(904bp)が核酸マーカー(A)に相当する。また、言うまでもないが、増幅される核酸マーカー(A)のサイズは、オオムギの個体毎に多少の変動がある。核酸マーカー(A)は、セントロメアから30%～47%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する(実施例参照)。

【0026】なお、核酸マーカーの位置は、1H染色体長腕の全長を100%として、セントロメアからの距離を百分率(%)で示すこととする。

【0027】プライマーセット(B)は、配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号4に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット(B)は、オオムギゲノム上の核酸マーカーBCD386(Kunzel: データベースGrain Genes)が座乗する遺伝子座の一部(本発明にかかる核酸マーカー(B))を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは、制限酵素HaeIIIの認識サイトを持たない約700bpの増幅産物(核酸マーカー(B))を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは制限酵素HaeIIIの認識サイトを持つ約700bpの増幅産物を生じさせる(オオムギとコムギとの間での制限酵素断片長多型(RFLP))。なお、図4は、核酸マーカーBCD386周辺のcDNA塩基配列(すなわちイントロンを除く塩基配列)を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット(B)に相当する。また、言うまでもないが、増幅される核酸マーカー(B)のサイズは、オオムギの個体毎に多少の変

動がある。核酸マーカー（B）は、セントロメアから30%～47%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する（実施例参照）。

【0028】プライマーセット（C）は、配列番号5に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット（C）は、オオムギゲノム上の核酸マーカーMWG943（Kunzelの私信による）が座乗する遺伝子座の一部（本発明にかかる核酸マーカー（C））を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約1080bpの増幅産物（核酸マーカー（C））を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約1110 bpの増幅産物を生じさせる。なお、図5は、核酸マーカーMWG943周辺のゲノムDNA塩基配列を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット（C）に相当し、「・・・」は配列不明なギャップに相当する。また、言うまでもないが、生じる増幅産物のサイズは、オオムギまたはコムギの個体毎に多少の変動があるが、両者間の多型の検出に影響のでない程度である。核酸マーカー（C）は、セントロメアから72%～82%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する（実施例参照）。

【0029】プライマーセット（D）は、配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット（D）は、オオムギゲノム上の核酸マーカーJrg12（Leeら：Planta 199:p625-632）が座乗する遺伝子座の一部（本発明にかかる核酸マーカー（D））を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約390bpの増幅産物（核酸マーカー（D））を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは増幅産物を全く生じさせない。なお、図6は、核酸マーカーJrg12周辺のcDNA塩基配列を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット（D）に相当し、この2領域を両端とする連続した二本鎖ポリヌクレオチド（386bp）が核酸マーカー（D）に相当する。また、言うまでもないが、増幅される核酸マーカー（D）のサイズは、オオムギの個体毎に多少の変動がある。核酸マーカー（D）は、セントロメアから47%～72%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する（実施例参照）。

【0030】プライマーセット（E）は、配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット（E）は、オオムギゲノム上の核酸マーカーHor3（Sorensenら：Mol. Gen. Genet. 250, 750-760(1996)）が座乗する遺伝子座の一部（本発明にかかる核酸マ

ーカー（E））を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約900bpの増幅産物（核酸マーカー（E））を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは増幅産物を全く生じさせない。なお、図7、8は、核酸マーカーHor3周辺のゲノムDNA塩基配列を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット（E）に相当し、この2領域を両端とする連続した二本鎖ポリヌクレオチド（904bp）が核酸マーカー（E）に相当する。また、言うまでもないが、増幅される核酸マーカー（E）のサイズは、オオムギの個体毎に多少の変動がある。核酸マーカー（E）は、セントロメアから47%～72%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する（実施例参照）。

【0031】プライマーセット（F）は、配列番号11に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号12に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるPCRプライマーセットである。プライマーセット（F）は、オオムギゲノム上の核酸マーカーqB19.1b（Stacyら：Plant Mol. Biol. 28, 1039-1054(1995)）が座乗する遺伝子座の一部（本発明にかかる核酸マーカー（F））を増幅するものであり、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは約570bpの増幅産物（核酸マーカー（F））を生じさせる一方で、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRでは増幅産物を全く生じさせない。なお、図9、10は、核酸マーカーqB19.1b周辺のゲノムDNA塩基配列を示すものであり、この塩基配列中で下線が付された2領域が上記プライマーセット（F）に相当し、この2領域を両端とする連続した二本鎖ポリヌクレオチド（570bp）が核酸マーカー（F）に相当する。また、言うまでもないが、増幅される核酸マーカー（F）のサイズは、オオムギの個体毎に多少の変動がある。核酸マーカー（F）は、セントロメアから47%～72%の範囲内にある1H染色体長腕上に位置する（実施例参照）。

【0032】また、上記のプライマーセット（A）～（F）はいずれも、公知の方法により容易に合成可能な一対のオリゴヌクレオチドからなるので、その製造方法についての説明は省略する。

【0033】なお、本発明のプライマーセット（A）～（F）により増幅される核酸マーカー（A）～（F）のうち、核酸マーカー（B）、（C）については、オオムギ中でこれをPCR増幅するためのSTS(sequence tagged site)プライマーがすでにKunzelらにより公表されている（Genetics, 154:p397-412, 2000など）。しかし、このSTSプライマーを用い、コムギ×オオムギ雑種のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行うと、得られる増幅産物はオオムギとの間で違い（多型）を示さない。つまり、上記STSプライマーは、コムギの背景でオオムギの染色体を検出する目的（本発明の目的）に利用できな

いことが判明している。

【0034】また、核酸マーカー（A）、（D）、（E）については、RFLP（制限酵素断片長多型）を利用してオオムギの遺伝地図上には既にマッピングされていた。しかし、これらオオムギ由来の核酸マーカーを検出するためのPCRプライマーについては、コムギの背景で使用可能なものはおろか、オオムギ中で使用可能なものすら報告がなされていない。なお、核酸マーカー（F）については、これを検出するためのPCRプライマーの設計や、RFLPを利用したマッピングなどに関する報告がなされていない。

【0035】2. プライマーセット（A）～（F）の用途

前記のように、本発明にかかるプライマーセット（A）～（F）は、コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRと、オオムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRとで、増幅結果に有意な多型が認められる、いわば、1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規なPCRプライマーセットである。また、実施例にて後述するように、オオムギの1H染色体長腕（一部）が導入されたコムギから取得したゲノムDNAを鋳型とし、上記プライマーセット（A）～（F）の一つを用いて増幅反応を行えば、当該1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得られることも確認済である。

【0036】すなわち、これらプライマーセット（A）～（F）は、例えば、1）オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギ（形質転換コムギ）から取得したDNAを鋳型とし、上記プライマーセット

（A）～（F）の少なくとも一つを用いて増幅反応を行い、当該オオムギの1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、この1H染色体長腕が上記コムギの細胞に実際に導入されているか否かを判定する目的で利用可能であり、その他、2）オオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられたコムギ（形質転換コムギ）から取得したDNAを鋳型とし、上記プライマーセット（D）～（F）の少なくとも一つを用いて増幅反応を行い、オオムギの1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得られるか否かにより、上記コムギの稔性の有無を判定する目的で利用可能である。以下、プライマーセット（A）～（F）の具体的な用途・利用条件・用語の定義などについて詳細に説明を行う。

【0037】（用語の定義）本発明において「オオムギ」とは、「*Hordeum vulgare*（学名）」と称される植物全般を指すものとする。この理由として、「*Hordeum vulgare*（学名）」の主要3系統である二条オオムギ（ヤバネオオムギとも称される：*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*）、六条オオムギ（*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*）、野生型オオムギ（*Hordeum vulgare* ssp. *spontanum*）は、互いにゲノム構成が極めて類似しており、また、本発明にかかるプライマーセット（A）～（F）が

異なる系統で共通に使用できることを確認済であることが挙げられる（実施例参照）。

【0038】本発明において「コムギ」とは、特に好ましくは六倍体の普通系コムギ *Triticum aestivum* を指すが、*Triticum aestivum* と一部重複した遺伝的背景を有するコムギであって、かつ、その細胞内にオオムギ染色体を導入可能なもの（オオムギ染色体による形質転換が可能なコムギ）であれば、特に *Triticum aestivum* のみに限定されない。すなわち、「コムギ」には、例えば、六倍体のジュコブスキー系コムギ（*T. zhukovsky*）、四倍体コムギ（*T. turgidum*, *T. timopheevi*）、二倍体コムギ *T. monococcum*、タルホコムギ（*Triticum taushii*（別名 *Aegilops squarrosa*））も含まれる。このような「コムギ」では、オオムギ・コムギ間で多型が見られるPCR増幅結果が得られると期待される。

【0039】なお、*Triticum aestivum* を除くコムギの中では、上記普通系コムギのAおよびBゲノムの提供親である *Triticum turgidum* や、普通系コムギのDゲノムの提供親であるタルホコムギがより好ましく、中でも、品種改良の対象とされる栽培コムギであるという点や、二倍体と比較して異種染色体添加への耐性がより高いという点で *Triticum turgidum* が特に好ましい。

【0040】本発明において「形質転換コムギ」とは、コムギ×オオムギ間の交配（戻し交雑なども含む）、または、遺伝子工学的手法により、細胞内にオオムギ染色体の少なくとも一部の導入が試みられた上記「コムギ」を指すものとする。すなわち、「形質転換コムギ」には、オオムギ染色体により実際に形質転換されたものはもちろん、形質転換が試みられたが失敗したものも含まれる。また、「形質転換コムギ」の範疇には、交配により作出された植物体（雑種コムギ）およびその子孫；根、茎、葉、生殖器官（花器官および種子を含む）などの各種器官；各種組織；細胞；などが含まれ、さらにはプロトプラスト、スフェロプラスト、誘導カルス、カルスからの再生個体およびその子孫、なども含まれるものとする。

【0041】なお、上記「遺伝子工学的手法（遺伝子操作技術）」とは、コムギの細胞内に異種染色体（遺伝子）を導入するために確立された公知の手法を指すものとする。具体的には、例えば、ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、リボソーム法、適切なベクター系を用いた導入法、などが挙げられる。

【0042】（形質転換コムギからのDNAの取得、および、プライマーセット（A）～（F）を用いたPCR増幅）前記形質転換コムギについて、1）オオムギ1H染色体長腕が導入されているか否かを判定する目的で、あるいは、2）当該形質転換コムギの稔性の有無を判断する目的でPCR増幅を行う際には、まず、鋳型となる形質転換コムギの全ゲノムDNAを抽出する（DNA抽

出工程)。この工程には、例えば、CTAB法(細胞工
学別冊 植物細胞工学シリーズ7 植物のPCR実験ブ
ロトコールド34~40頁(秀潤社(2000年))、およびMurray
ら(Nucleic Acids Res., 8:p4321-4325, 1980)参照)など
公知のDNA抽出法を採用することができる。

【0043】また、上記全ゲノムDNAを鋳型とし、プ
ライマーセット(A)~(F)のいずれかを用いてPCR
増幅を行う際(PCR増幅工程)の反応条件も、通常
の条件に従って行えばよい(Saiki, Science, 230, 1350
-1354(1985); PCRテクノロジー、宝酒造(株)1990年発
行; 等参照)。より具体的には、標的二本鎖DNA(鋳
型を含む)の熱変性工程は、90℃~96℃、より好ま
しくは94℃~96℃の温度範囲内で、約1分間~3分
間、より好ましくは約1分間~2分間行えばよい。ま
た、プライマーのアニーリング工程は、40℃~60
℃、より好ましくは50℃~60℃の温度範囲内で、約
1分間~3分間、より好ましくは約1分間~約2分間行
えばよい。さらに、DNAポリメラーゼによる鎖伸長工
程は、70℃~74℃、より好ましくは72℃~74℃
の温度範囲内で、約1分間~4分間、より好ましくは約
2分間~3分間行えばよい。

【0044】上記熱変性工程、アニーリング工程、およ
び鎖伸長工程を一サイクルとするPCRのサイクル数も
特に限定されないが、通常は20~40サイクル、より
好ましくは25~35サイクル行えばよい。その他、使
用するDNAポリメラーゼの種類(Taqポリメラーゼな
どの耐熱性ポリメラーゼ)・量、試薬の種類・量などは
従来と同様であり、詳細な説明を省略する。

【0045】形質転換コムギの細胞内に1H染色体長腕
が実際に導入されていれば、プライマーセット(A)、
(D)、(E)、(F)のいずれかを用いてPCR増幅
工程を行った場合、1H染色体長腕に特異的な増幅産物
のみが生成する。また、プライマーセット(C)を用い
た場合には、1H染色体長腕に特異的な増幅産物と、コ
ムギのゲノムDNAに特異的な増幅産物とが生成する
が、両者のサイズには明確な相違(多型)が認められ
る。よって、得られた増幅産物のサイズを特定する手
法、例えば、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲル
を用いた電気泳動により、1H染色体長腕に特異的な増
幅産物が得られているか否かを判定する(1H染色体由
来の増幅産物(増幅断片)の検出工程)。なお、電気泳
動の条件などは一般的な条件に従えばよいので、詳細な
記述は省略する(新臨床医のための分子医学シリーズ
「よく分かる遺伝子工学」p27-31:羊土社発行(2000年)
など参照)。

【0046】一方、プライマーセット(B)を用いてP
CR増幅工程を行った場合には、1H染色体長腕に特異
的な増幅産物と、コムギのゲノムDNAに特異的な増幅
産物との間に実質的なサイズの相違が認められない。た
だし、両増幅産物の間には、制限酵素HaeIIIにより検出

可能なRFLPが認められるので、当該制限酵素による
増幅産物の消化を行った後に、電気泳動などに供すれば
よい(1H染色体由来の増幅産物(増幅断片)の検出工
程)。

【0047】つまり、増幅産物の検出工程において、1
H染色体長腕に特異的な増幅産物が認められると、形質
転換コムギの細胞内に1H染色体長腕(少なくとも一
部)が導入されたと確認され、一方、当該増幅産物が認
められないと1H染色体長腕が導入されていないと確認
される。そして、当該1H染色体長腕の導入確認方法を
採用すれば、例えば、比較的低い頻度でしか起こらない
コムギへのオオムギ1H染色体長腕導入株(形質転換コ
ムギの実用系統)を効率よく選抜することができる。

【0048】また、前記核酸マーカー(A)・(B)
(第一群)、核酸マーカー(C)(第二群)、核酸マー
カー(D)・(E)・(F)(第三群)は、1H染色体
長腕の異なる領域内に位置づけられているので(図11
参照)、異なる群に分類される核酸マーカーを増幅する
二以上のプライマーセットを併用して、標的遺伝子を含
むできるだけ小さな1H染色体断片が導入された形質転
換コムギ(実用系統)を早期に選抜し、育成することが
可能となる。

【0049】さらに、増幅産物の検出工程において、プ
ライマーセット(D)、(E)、(F)により1H染色
体長腕に特異的な増幅産物が得られた場合には、試験に
供された形質転換コムギは高確率で不稔である(実施例
参照)。これは、核酸マーカー(D)、(E)、(F)
が座乗する1H染色体上の領域に、コムギの背景におい
て雄性不稔を引き起こす遺伝因子が存在するためと考え
られる。よって、プライマーセット(D)、(E)、
(F)により1H染色体長腕に特異的な増幅産物が得ら
れるか否かで、形質転換コムギが稔性を有するか否かを
判別可能となる。よって、例えば、稔性を有する形質転
換コムギのみを早期(例えば、幼苗期)に選別可能とな
る。

【0050】(本発明にかかるプライマーセットを含ん
でなるキット)すでに説明のように、前記プライマーセ
ット(A)~(F)はいずれも、オオムギの1H染色体
長腕(その一部を含む)が、コムギの細胞内に導入され
ているか否かを判定する際に使用できる。よって、これ
らプライマーセット(A)~(F)のいずれかを用いれ
ば、「コムギ背景における1H染色体長腕導入の成否判
定用キット(キットA)」を構築可能となる。また、プ
ライマーセット(D)、(E)、(F)はいずれも、得
られた形質転換コムギの稔性の有無を予断する際に使用
できる。よって、これらプライマーセット(D)、
(E)、(F)のいずれかを用いれば、「形質転換コム
ギの稔性判定用キット(キットB)」を構築可能とな
る。

【0051】なお、上記キットA・Bは、必要なプライ

マーセットの他に、例えば、DNAポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼ)、反応緩衝液、dNTPs溶液など、PCRに必須の試薬を組み合わせる構成すればよい。

【0052】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例の記載に限定されるものではない。また、転座染色体の記載に用いたオオムギ染色体の番号は、Hereditas,126:p1-16(1997)に記載のLinde-Laursenらの表記法に従った。

【0053】(1) コムギの背景で検出可能な核酸マーカースクリーニング

オオムギ1H染色体由来の核酸マーカーの中から、コムギの背景で検出可能なものをスクリーニングした。具体的には、Blakeらの文献(Theor Appl Genet,93:p826-832,1996)、Sayed-Tabatabaeiらの文献(Barley Genetics Newsletter,28:p15-18,1998)、Kunzelらの文献(Genetics,154:p397-412,2000)、Liuらの文献(Theor Appl Genet,93:p869-876,1996)、およびRamseyらの文献(Genetics,156:p1997-2005,2000)に報告されたPCRマーカーについて、当該文献に記載された約50のプライマーセット(オオムギのゲノムDNA用)をそのまま用いてコムギの背景で検出可能か否かの検定を行った。

【0054】スクリーニングの方法を以下に簡潔に記す。まず、上記文献に記載された核酸マーカーに係るPCRプライマーセットを委託合成した。次に、コムギ親(Triticum aestivumの一品種「新中長」、オオムギ親(H.spontaneum(岡山大学資源生物科学研究所 大麦・野生植物資源研究センターの登録系統番号: OUH602))、コムギ親にオオムギ1H染色体短腕を添加したもの(短腕添加体と称する)、およびコムギ親にオオムギ1H染色体長腕を添加したもの(長腕添加体と称する)の計4系統のゲノムDNAを鋳型として、PCRを行った。なお、文献に記載のPCR条件では増幅ができない場合、アニーリング温度の変更、各ステップの時間の変更などを行い、PCRの条件を最適化した。その後、PCR増幅産物を電気泳動して、コムギの背景で検出可能なPCRマーカーをスクリーニングした。

【0055】この実験を上記約50のプライマーセットについて行った結果、1H染色体上の核酸マーカーBCD1072, BCD454A, CD089, CD0312など(前記文献、及び図11参照)を増幅するための19のプライマーセットにおいて、コムギゲノムを鋳型とした場合とオオムギゲノムを鋳型とした場合とで増幅産物に多型が見られることが判明した。つまり、前記短腕添加体または長腕添加体のいずれかのゲノムDNAを鋳型とし、上記19のプライマーセットのいずれかをを用いたPCRでは、コムギゲノムに特異的な増幅産物とオオムギゲノム(1H染色体)に特異的な増幅産物との双方が得られた。なお、核酸マーカーBCD454A, CD089, CD0312については、コムギ

とオオムギとの間での多型を検出するために、増幅産物を適切な制限酵素で消化する必要があった。

【0056】また、図11に示す核酸マーカーのうち、核酸マーカー(A)～(F)に相当するG1b1,BCD386,MWG943,Jrg12,Hor3,qB19.1bについては、コムギの背景で検出できなかった。その理由は、核酸マーカー(B),(C)では、文献に公開されたSTSプライマー(オオムギゲノム用)が、コムギ親とオオムギ親との間で増幅産物に多型(サイズ/RFLP)を与えないからであった。また、核酸マーカー(A),(D),(E),(F)では、これをオオムギ内で検出するためのプライマーセットすら公開されていないためであった。

【0057】(2) 核酸マーカー(A)～(F)をコムギ背景で検出するための新規プライマーセット(A)～(F)の設計、およびスクリーニング

そこで、オオムギ1H染色体由来の核酸マーカー(A)～(F)が座乗する遺伝子座をコムギの背景で検出するための、新規PCRプライマーセットの設計、およびスクリーニングを試みた。

【0058】まず、図1から図10に示す塩基配列情報を元にプライマー設計用ソフトウェアPrimer 3(Whitehead Institute 社,USA)を使用して、核酸マーカー(A)～(F)毎に、PCRプライマーセットの候補を数種類ずつ設計した。次いで、これらプライマーセットの候補から、コムギの背景でこれら核酸マーカー(A)～(F)を再現性良く検出できるプライマーセット(A)～(F)を選抜した。

【0059】(3) 形質転換コムギの作出
コムギ(Triticum aestivum)の一品種「新中長(Scnと表記する場合もある)」と、1H染色体の関与するオオムギ相互転座6系統T1H-2Haf, T1H-5Haf, TS36, T1H-6Hz, T1H-5HafおよびT1H-2Hah(花粉親)とを交配し、胚培養によってF1雑種を獲得した。胚培養は、文献(「Genes and Genest.Syst.,72:p101-106,1997」、「Theor. Appl. Genet,91:p1203-1209,1995」および「Euphytica 97:p91-96,1997」)に記載の方法により行った。

【0060】上記オオムギ相互転座系統のうちTS36を除く5系統は、栽培二条オオムギ(Hordeum vulgare ssp. vulgare)系統St.13559(St.13559と表記する場合もある)から誘発されたもので、Kunzelより分譲を受けたものである。TS36は、栽培六条オオムギ系統竹林茨城1号から誘発されたものである。なお、オオムギ相互転座系統T1H-2HafおよびT1H-2Hahは1H-2H染色体間において、オオムギ相互転座系統T1H-5HafおよびT1H-5Hafは1H-5H染色体間において、オオムギ相互転座系統T1H-6Hzは1H-6H染色体間において、オオムギ相互転座系統TS36は1H-2H染色体間において相互転座が発生した系統である。また、各オオムギ相互転座系統の転座点(図11中では、系統名から「-」を除いた名称を付す)の位置は図11に示す通りであり、TS36を除いて

は、後述するC-バンド法によりKunzeららの報告を再確認したものである。

【0061】次いで、F1雑種（一回親）をコムギ（反復親）で戻し交雑した後代で、各相互転座系統に含まれる2種類の転座染色体の片方だけを持つ個体を、染色体分染法（C-バンド法）により選抜し、各転座染色体を個別にコムギに添加した形質転換コムギの12系統（6×2）を育成した。C-バンド法（C-分染法）は、Giraldezらの方法（Z. Pflanzenzüchtg, 83:p40-48, 1979）を参考にして行った。

【0062】なお、以下の説明では、オオムギ相互転座系統T1H-2Hafが有する2種類の転座染色体をT1H2HafおよびT2H1Hafとする。転座染色体T1H2Hafは1H染色体上の転座点T1H2Hafよりも基部（セントロメア）側の断片を持つものであり、転座染色体T2H1Hafは転座点T1H2Hafよりも末端側の断片を持つものである。また、オオムギ相互転座系統T1H-5Hagが有する2種類の転座染色体をT1H5HagおよびT5H1Hagとする。転座染色体T1H5Hagは1H染色体上の転座点T1H5Hagよりも基部（セントロメア）側の断片を持つものであり、転座染色体T5H1Hagは転座点T1H5Hagよりも末端側の断片を持つものである。また、オオムギ相互転座系統T1H-6Hzが有する転座染色体をT1H6HzおよびT6H1Hzとする。転座染色体T1H6Hzは1H染色体上の転座点T1H6Hzよりも基部（セントロメア）側の断片を持つものであり、転座染色体T6H1Hzは転座点T1H6Hzよりも末端側の断片を持つものである。また、オオムギ相互転座系統T1H-5Hafが有する2種類の転座染色体をT1H5HafおよびT5H1Hafとする。転座染色体T1H5Hafは1H染色体上の転座点T1H5Hafよりも基部（セントロメア）側の断片を持つものであり、転座染色体T5H1Hafは転座点よりも末端側の断片を持つものである。また、オオムギ相互転座系統T1H-2Hahが有する2種類の転座染色体をT1H2HahおよびT2H1Hahとする。転座染色体T1H2Hahは1H染色体上の転座点T1H2Hahよりも基部（セントロメア）側の断片を持つもの、転座染色体T2H1Hahは転座点T1H2Hahよりも末端側の断片を持つものである。なお、オオムギ相互転座系統TS36が有する2種類の転座染色体は以下の説明に用いないため、特に名称を付さない。

【0063】図12には、TS36に係るものを除く、供試した転座染色体のC-バンド法によるバンド像を示している。1H染色体が関与する転座染色体では、その末端側（図11では各転座点より下側の領域）を含むものであるか、セントロメア側を含むものであるかの判別に、1H染色体上の三つのC-バンド（図11、12参照）

を利用する。なお、図12中「←」は各転座点を示すので、オオムギ相互転座系統T1H-2Haf、T1H-5Hag、T1H-6Hz、T1H-5Haf、あるいはT1H-2Hahが有する上下一組の転座染色体のうち上側に配されたものは、各転座点よりも基部側（セントロメア側）の1H染色体部分（転座染色体T1H2Haf、T1H5Hag、T1H6Hz、T1H5Haf、あるいはT1H2Hah）が添加された像を示し、下側に配されたものは各転座点よりも末端側の1H染色体部分（転座染色体T2H1Haf、T5H1Hag、T6H1Hz、T5H1Haf、あるいはT2H1Hah）が添加された像を示している。

10

【0064】なお、図13は、オオムギ1H-2H染色体間での相互転座系統とコムギとを交配させて雑種を取得し、次いで、2種類の転座染色体が別途コムギに添加された形質転換コムギの系統をC-バンド法にて選抜し、育成するステップを模式的に示したものである。

【0065】（4）コムギの背景での核酸マーカー（A）～（F）の検出

コムギの背景での核酸マーカー（A）～（F）の検出は、以下のようにして行った。

20

【0066】はじめに、オオムギ染色体の導入が試みられたコムギ（形質転換コムギ）として、1）コムギ親「新中長(Scn)」にオオムギ1H染色体短腕を添加したもの(Scn+1HS'')と表記)、2）コムギ親「新中長」にオオムギ1H染色体長腕を添加したもの(Scn+1HL'')と表記)、3）オオムギ由来の転座染色体T1H2Haf、T2H1Haf、T1H5Hag、T5H1Hag、T1H6Hz、T6H1Hz、T1H5Haf、T5H1Haf、T1H2HahおよびT2H1Hahが個別に添加されたコムギの10系統（前記(3)参照）、を準備した。また、他の植物試料として、コムギ「新中長」、栽培二条オオムギSt.13559、および野生型オオムギH.spontaneum(OJH602)、を準備した。

30

【0067】次いで、上記植物試料の葉身からCTAB法により全ゲノムDNAを抽出し、当該ゲノムDNAを鋳型として、プライマーセット（A）～（F）を用いたPCRを行った。PCR反応液の組成は、全量を15μlとし、鋳型DNA 10～40ng、1×バッファー（Applied Biosystems社 AmpliTaq Gold DNA polymeraseに添付）、AmpliTaq Gold DNA polymerase 0.75U、塩化マグネシウム2.5mM、dNTPs 200μM、各プライマーセット300nM、グリセロール10%（v/v）となるように調製した。また、増幅反応は、Program Temp Control System PC-800（アステック社）を用いて、以下の表1に示す条件で行った。

【0068】

〔表1〕

マーカー	アニーリング		伸長時間	サイクル数	期待される増幅産物長 (b p)	増幅産物サイズ (b p)		制限酵素処理の有無	制限酵素処理後の断片サイズ (b p)	
	温度	時間				オオムギ	コムギ		オオムギ	コムギ
G1b1 (A)	55℃	1分	2分	35	904	900	—	不要		
BCD 386 (B)	54℃	1分	2分	35	503	700	700	要(HaeIII)	700	500
MWG 943 (C)	52℃	2分	3分	35	ca. 1030	1080	1110	不要		
Jrg12 (D)	54℃	1分	2分	35	386	390	—	不要		
Hor3 (E)	57℃	1分	2分	35	904	1100+900	—	不要		
gB19.1b (F)	56℃	1分	2分	35	570	570	—	不要		

【0069】なお、サイクル反応前の初期反応工程は95℃で9分間、サイクル反応時の熱変性工程は95℃で1分、鎖伸長工程の反応温度は72℃であり、いずれの核酸マーカー（A）～（F）を増幅する場合でも共通とした。また、PCRのサイクル反応後は72℃で2分間静置し、次いで、増幅産物を含む反応液を4℃にて保存した。

【0070】次いで、得られた増幅産物を2%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドによって染色し、核酸マーカー（A）～（F）を検出した。結果は表1および図14・15に示す。

【0071】なお、図14・15中、T1H-2Haf「p」、T1H-2Haf「d」は順に、転座染色体T1H2Haf、T2H1Hafが個別に添加されたコムギの系統を指す。また、T1H-5Haf「p」、T1H-5Haf「d」は順に、転座染色体T1H5Haf、T5H1Hafが個別に添加されたコムギの系統を指す。また、T1H-6Hz「p」、T1H-6Hz「d」は順に、転座染色体T1H6Hz、T6H1Hzが個別に添加されたコムギの系統を指す。また、T1H-5Haf「p」、T1H-5Haf「d」は順に、転座染色体T1H5Haf、T5H1Hafが個別に添加されたコムギの系統を指す。また、T1H-2Hah「p」、T1H-2Hah「d」は順に、転座染色体T1H2Hah、T2H1Hahが個別に添加されたコムギの系統である。すなわち、「p」は転座点よりも基部（セントロメア）側の1H染色体部分が添加されたコムギの系統を指し、「d」は転座点よりも末端側の1H染色体部分が添加されたコムギの系統を指す。また、図中の「M」は、サイズマーカーを示している。

【0072】表1および図14に示すように、核酸マーカー（A）を増幅するプライマーセット（A）を用いたPCRの場合、コムギ「新中長(Scn)」では増幅産物が得られず、一方、オオムギSt.13559、OUH602では約900bpの増幅産物が得られた。また、核酸マーカー（A）を含む1H染色体領域が添加されたコムギScn+1HL', T1H-2Haf「d」、T1H-5Haf「p」、T1H-6Hz「p」、T1H-5Haf「p」、T1H-2Hah「p」では、いずれも約900bpの増幅産物（核酸マーカー（A））が得られた。加えて、核酸マーカー（A）は、転座点T1H2HafとT1H5Hafとの間の1H染色体長腕上に座乗することが分かる。この理由は、転座点T1H2Hafが関与する転座染色体が添加されたコムギの系統

と、転座点T1H5Hafが関与する転座染色体が添加されたコムギの系統とを境にして、核酸マーカー（A）が導入された系統が「d」から「p」に変化していることによる（図11、15も参照）。

【0073】核酸マーカー（B）を増幅するプライマーセット（B）を用いたPCRの場合、得られた増幅産物を制限酵素HaeIIIで消化した後に電気泳動にかけること、コムギ「新中長(Scn)」では約500bpの、オオムギSt.13559では約700bpの増幅産物が得られた。また、同様の処理を行うことで、核酸マーカー（B）を含む1H染色体領域が添加されたコムギT1H-2Haf「d」、T1H-5Haf「p」、T1H-6Hz「p」、T1H-5Haf「p」、T1H-2Hah「p」では、いずれも約700bpの増幅産物（核酸マーカー（B））と約500bpの増幅産物（コムギの核酸マーカー）とが得られた。加えて、核酸マーカー（B）は、転座点T1H2HafとT1H5Hafとの間の1H染色体長腕上に座乗することが分かる（核酸マーカー（A）に関する説明参照）。なお、核酸マーカー（B）のサイズは、図4から推定された期待値(503bp)より明らかに大きい、これは増幅した領域にイントロンが存在するためと推測される。

【0074】核酸マーカー（C）を増幅するプライマーセット（C）を用いたPCRの場合、コムギ「新中長(Scn)」では約1110bpの、オオムギSt.13559、OUH602では約1080bpの増幅産物が得られた。また、核酸マーカー（C）を含む1H染色体領域が添加されたコムギT1H-2Haf「d」、T1H-5Haf「d」、T1H-6Hz「d」、T1H-5Haf「p」、T1H-2Hah「p」では、いずれも約1080bpの増幅産物（核酸マーカー（C））と約1110bpの増幅産物（コムギの核酸マーカー）とが得られた。加えて、核酸マーカー（C）は、転座点T1H6HzとT1H5Hafとの間の1H染色体長腕上に座乗することが分かる（核酸マーカー（A）に関する説明参照）。なお、表1に、核酸マーカー（C）の期待される増幅産物長は「ca.1030」と記載した。この「ca.1030」は、次のように推定した。まず、MWG943のインサートの全長が1.8kbpであることから、塩基配列が決定されていない内部のギャップ長を約800bpと推定した。次に、塩基配列の分かっている増幅部分226bpを、塩基配列が決定されていない内部のギャップ長約800bpに加え

て、期待される増幅産物長を約1030bpと推定した。

【0075】核酸マーカー（D）／（F）を増幅するプライマーセット（D）／（F）を用いたPCRの場合、コムギ「新中長(Scn)」では増幅産物が得られず、一方、オオムギSt.13559, OUH602では約390bp／570 bpの増幅産物が得られた。また、核酸マーカー（D）を含む1 H染色体領域が添加されたコムギScn+1HL', T1H-2Haf「d」, T1H-5Hag「d」, T1H-6Hz「p」, T1H-5Haf「p」, T1H-2Hah「p」では、いずれも約390bp／570bpの増幅産物（核酸マーカー（D）／（F））が得られた。加えて、核酸マーカー（D）／（F）は、転座点T1H2HafとT1H5Hagとの間の1 H染色体長腕上に座乗することが分かる（核酸マーカー（A）に関する説明参照）。

【0076】また、核酸マーカー（E）を増幅するプライマーセット（E）を用いたPCRの場合、コムギ「新中長(Scn)」では増幅産物が得られず、一方、オオムギSt.13559, OUH602では約900bp・1100 bpの増幅産物が得られた。また、核酸マーカー（E）を含む1 H染色体領域が添加されたコムギScn+1HL', T1H-2Haf「d」, T1H-5Hag「d」, T1H-6Hz「p」, T1H-5Haf「p」, T1H-2Hah「p」では、いずれも約900bp・1100bpの増幅産物（核酸マーカー（E））が得られた。加えて、核酸マーカー（E）は、転座点T1H2HafとT1H5Hagとの間の1 H染色体長腕上に座乗することが分かる（核酸マーカー（A）に関する説明参照）。なお、このPCRでは、期待される約900bpのバンドに加え約1100bpのバンドも出現しているが、この理由は、1 H染色体上にHor3の遺伝子座が近接して2コピー存在するためと推測される。

【0077】以上のように、プライマーセット（A）～（F）の何れかを用いれば、オオムギのゲノムDNAを 30 鋳型とした場合と、コムギのゲノムDNAを鋳型とした＊

＊場合とで、PCR増幅の結果に明確な多型が見られる。さらに、これらプライマーセット（A）～（F）の何れかを用い、オオムギの1 H染色体長腕が導入されたコムギのゲノムDNAを鋳型としたPCRを行うと、オオムギに特異的な増幅産物（核酸マーカー（A）～（F））が得られることも確認済である。つまり、これらのプライマーセット（A）～（F）は、オオムギ由来の核酸マーカー（A）～（F）を、コムギの遺伝的背景で検出する目的で使用可能である。また、核酸マーカー（A）～（F）はいずれも1 H染色体長腕の特定領域内に位置づけられているので（図11参照）、これを増幅するプライマーセット（A）～（F）を用いたPCRによって、例えば、1 H染色体長腕の特定領域（特定の遺伝子座）がコムギの細胞内に導入されているか否かを効率的に判定可能となる。

【0078】（5）コムギとオオムギとの交雑後代における稔性の判定

コムギとオオムギとを交雑して得られた後代は、しばしば不稔となる。また、不稔（特に雄性不稔）を引き起こす因子は、1 H染色体上に座乗することが知られている。そこで、オオムギ相互転座6系統とコムギとの交配から育成されたオオムギの転座染色体を個別に添加したコムギ12系統（前記（3）・（4）参照）の稔性の有無を調査した。その調査結果を表2に示す。なお、表2において、コムギの系統名は、交配に用いたオオムギ相互転座系統名（T1H-2Haf, …, T1H-2Hah）と、当該オオムギ相互転座系統が「p」型／「q」型の何れの転座染色体を有するか、との組み合わせで規定される。

【0079】

【表2】

	転座点よりも基部側を 添加した系統 「p」	転座点よりも末端側を 添加した系統 「d」
T 1 H - 2 H a f	可稔	不稔
T 1 H - 5 H a g	可稔	不稔
T S 3 6	可稔	不稔
T 1 H - 6 H z	不稔	可稔
T 1 H - 5 H a f	不稔	可稔
T 1 H - 2 H a h	不稔	可稔

【0080】この調査結果により、コムギの背景で不稔を引き起こすオオムギ1 H染色体上の遺伝要因（不稔因子）は、相互転座点T1H5Hag(TS36)とT1H6Hzとの間に存在すると結論された（図11参照）。なお、相互転座点T1H5HagとTS36とは、染色体観察によっても、PCRマーカーによる調査でも相対的な位置関係を決定できなかった。

【0081】また、すでに説明したように、相互転座点 50

T1H5Hag(TS36)とT1H6Hzとの間に位置する1 H染色体長腕上の領域には、上記不稔因子の他に、3つの核酸マーカー（D）、（E）、（F）（Jrq12, Hor3, およびqB19.1b）が位置づけられている。したがって、これら3つの核酸マーカー（D）、（E）、（F）は、形質転換コムギ（コムギ×オオムギ雑種など）において稔性を予測するPCRマーカーとして有用である。例えば、プライマーセット（D）、（E）または（F）を用い、形質転換

コムギのゲノムDNAを鋳型としたPCR増幅を行うことで、当該核酸マーカー（D）、（E）または（F）が検出される個体は雄性不稔、検出されない個体は稔性が正常、という形態で稔性の有無を判定することができる。

【0082】以下、プライマーセット（D）を利用した、形質転換コムギの稔性判定の実例につき説明する。はじめに、コムギにオオムギの1H染色体と6H染色体とが1本ずつ添加された個体（雑種）を準備した。なお、1H染色体とともに6H染色体が添加されると、そのコムギはある程度の雌性稔性は示す。次に、この個体にコムギ花粉を受粉させた戻し交雑後代（形質転換コムギ）を準備し、当該戻し交雑後代の幼苗から取得したゲノムDNAを鋳型にし、プライマーセット（D）を用いたPCRを行った。

【0083】その結果、調査した25個体のうち、11個体で核酸マーカー（D）（Jrg12）が検出された。次いで、上記交雑後代の幼苗を育成し、稔性の有無を確認した。その結果、核酸マーカー（D）が検出された11個体は全て雄性不稔であり、一方、残りの14個体の稔性は正常であることが確認された。このように、幼苗期における核酸マーカー（D）の有無を調査することで、稔性の有無を早期に判定することができる。

【0084】なお、本実施例ではコムギとして「新中長」を用いている。しかし、他の六倍体コムギの品種である「Chinese Spring」でも本発明の核酸マーカー（特に、核酸マーカー（D）、（F））、およびこれを増幅するプライマーセットが使用可能であることは確認済である。

【0085】

【発明の効果】本発明に係る新規プライマーセットは、以上のように、下記（a）ないし（c）の何れか一つに示される、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するためのプライマーセットである。（a）配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号2に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットA、（b）配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号4に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットB、（c）＊40

＊配列番号5に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットC。

【0086】また、本発明に係る他の新規プライマーセットは、以上のように、下記（d）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットである。（d）配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットD。

【0087】本発明に係るさらに他の新規プライマーセットは、以上のように、下記（e）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットである。（e）配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットE。

【0088】本発明に係るさらに他の新規プライマーセットは、上記の課題を解決するために、下記（f）に示す、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規プライマーセットである。（f）配列番号11に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号12に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとで構成されるプライマーセットF。

【0089】上記新規なプライマーセット（A）～（F）はいずれも、オオムギの1H染色体長腕由来の核酸マーカーを、コムギの背景で検出する目的で使用することができ、より具体的には、例えば、当該1H染色体長腕の特定領域がコムギの細胞内に導入されているか否かを効率的に判定することが可能となるという効果を奏する。特に、プライマーセット（D）～（F）は、上記1H染色体長腕にある不稔因子と連鎖した核酸マーカーを増幅することが判明しているため、オオムギ染色体の導入が試みられたコムギを対象として、その稔性の有無を判定することが可能となるという効果を加えて奏する。

【0090】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Newly synthesized primer sets for amplifying barley nucleotide markers on wheat genetic background

<130> A181P20

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

23

24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

ccaattgccca tctacgtgtg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

cttgaacatg ttgaccacgg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gcgccaaga gcagaataac

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

ttgtaccgg ttgacagaca

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

acaggatgga gaagatagag c

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

25
 <400> 6
 aggtaaagtg gaaaggcaaa t
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 7
 agctgaccat aacgacaatc
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 8
 ccgtaagccg ttatttagaa
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 9
 gagatcaatt cattgacagt ccac
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 10
 ttgtggagaa gttgtacttg ggta
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 11
 ccatatcgtc cggatgtacc
 <210> 12
 <211> 20

26

21

20

20

24

24

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 12

gccatcactc tctttctgcc

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明にかかるプライマーセット（A）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 2】図 1 に示す塩基配列情報の続きを示す図である。

【図 3】図 2 に示す塩基配列情報の続きを示す図である。

【図 4】本発明にかかるプライマーセット（B）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 5】本発明にかかるプライマーセット（C）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 6】本発明にかかるプライマーセット（D）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 7】本発明にかかるプライマーセット（E）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 8】図 7 に示す塩基配列情報の続きを示す図である。

＊ する。

【図 9】本発明にかかるプライマーセット（F）を設計する際に利用した、塩基配列情報を示す図である。

【図 10】図 9 に示す塩基配列情報の続きを示す図である。

【図 11】オオムギ 1 H 染色体上の転座点、および核酸マーカーの物理位置を示す図である。

【図 12】C-バンド法により染色された転座染色体を示す図である。

【図 13】オオムギ転座染色体が添加されたコムギの系統を作出する方法を示す図である。

【図 14】本発明にかかるプライマーセット（A）～（F）を用いた PCR の結果を示す図である。

【図 15】本発明にかかるプライマーセット（A）を用いた PCR の結果と、オオムギ 1 H 染色体との関係を位置づけた図である。

【図 4】

BCD386

BCD386-5 : Grain Genes というアメリカのデータベースから得た配列情報

```
ggcacgaggctgctgagaaagtttgtgatatttgtggcgatcaatgctt
cctggaaaggatgtcgccaccttgctgaactgcagcacaggaaacctagc
ttgcagcagtagaaactccagtgagggttttcatctatttcacacttcat
gcttactgcactggactattatgtgccaatatgaggtactggctgatcaa
attgtaaagatgggaaagagcaaacgaggaagaaaggcaaaaaccgcgcc
aaagagcagaataaacatccatcctttgccagaatgtcagggtacaggga
ttcacgtcgaggagatgagctcgaaaagccaactatttcgttgtctgag
atgtttcgctacaagctgaagtccatcgaagccaacaaggcatggatgaa
gacccctgagatgctggagaactgttccactgggctccatttcctgcgg
aacatctggagaatgcggaggagcaggtgatgccactgaagtcgcttcct
ttctttgcagctgatggatatatggcataattcgtgggttaagctcatgg
accaggtgacgctaacgatggaagtgagctataaccattctgccagagcca
ttgtaaatctactagagcagctgtaaataagcatgcatgactatactggg
agtgtatgctagatgctgacgtttattttgcttgaatcgtgtgtat
ctatgatgtttaggtttgcagacacgcctgtctgtcaaccgggtacaatc
cagcaaaactgttagactgggtttagtaaccataaactctatacatgtt
gcactgctcaca
```

【 図 1 】

Glb1

LOCUS HVGLB1 4849 bp DNA PLN 19-JU
L-1995

DEFINITION H. vulgare Glb 1 gene for 1-3, 1-4-beta-D-glucanase.

ACCESSION X56775

KEYWORDS lichenase.

SOURCE barley.

REFERENCE 4 (bases 1 to 4849)

AUTHORS Wolf, N.

TITLE Structure of the genes encoding *Hordeum vulgare* (L3, L4)-
beta-glucanase isoenzymes I and II and functional analysis of their
promoters in barley aleurone protoplasts

JOURNAL Mol. Gen. Genet. 234, 33-42(1992)

```

1 tttgacaagt ataaagacat gcttaactaa agtggtttga gtaattctat gattctttga
61 caaaaatctt aattaattag gtacacacaa aacacaaatg ttcttatgat aaacaaaatt
121 gttggtttct tgcaatataa taacaaaaca atagcatgta aaaatacgag catgtactat
181 atatataccg gtatgagacg gtaaaaggta gagagaccaa aggcttttga tgtactccaa
241 atctctttta attgacccca aatatccatt actaaaatat aatttcattt gtatacatgt
301 cacttcacga taagaaacaa caaagccgac aaaaccgttg cggccagttc tttcctacgt
361 aagtcatgtc aacttcaaag ataaaaaaaa aatcatcgcc aacaagtctc cgttgtgtca
421 attcttctta cgtaagttat gtcggattcc accgaacacg gtccttgcggt gaaaaaacgg
481 ccgccgaatg tcgttgagta agacgtgaac atatccgacg cggcgcgacc catcattgac
541 ctagaaaactt cactttcatg gtacatcatg ggtggagtcc aaaattcaaa ctattttttc
601 aaaagttggt tggtaccact atgaatgaat gaattatccc ctcccctac ctgcaacaac
661 aacctggtgt accggataac ctctgcccac caccagacac aactgtgag aaggcgggtga
721 cgcattgcaa ccggcctagg tagtcaatcg caacaggcta aataaatgtc gctggaggcg
781 ttgggcctgc gctcccgagt ggattggacc gaactatgtc tcctcggatc ctatataagg
841 ggccatgcacc ccgttgtggc ctcaccagaa aagaaacaac aagagcttta cagagagcct
901 tggcatcacc caccacacc ctcaccctcc aacgcagcta gagagagaaa gagaatggca
961 ggccaaggcg ttgcctccat gttggtcttg gcattgtccc tcggagcctt cgccctccatc
1021 ccacaaagtg attcccttc cttccctccc tctctctctc ttgaagtgat tgggtgcagt

```

【 図 1 0 】

```

1021 agccgtggcg ggcagactcg caggagcag atgggggagg aggggtacag cgagatgggg
1081 cgcaagggcg ggctgagcac caacgatgag tcggcgggcg agcgcgccgc caggggaggc
1141 atcgacatcg acgagtccaa gttaagacc aagtcctaga tgcgcctag caagcaagac
1201 gactgcttaa ttaggttggg gtggggtgtc agttaacctt gccggatgaa taatgtagg
1261 caggagtcct gacgtaagca cgcattgagg cgatc

```

【図 2】

```

1081 tttttttttt catgcaggga gtttctttga agatagtaat acgtacgttg atcttagctt
1141 tcattaagag aagcattagg gagctagcta ggtagcggc ggccatggtg tacccatgct
1201 cacataaacc tctgtgggac gtcacatagc ataccttctt ctgttttaggt gcatgtcgtc
1261 ttcggttctgc gttttattct tcccgcgcca tcagtcgcat ggtaaagcat gaacggccgg
1321 cgcccgccgg tctcattatt tacctcgatg cgtccatcaa tgcattggag cacagtaact
1381 tttcaaaaaa aaaattcgaa aactaaacac ggtaaatttt gtaaaaaaa tcgttttcac
1441 tcgctaaaag aatcaggagt cttgggtttt gctgcggagt atacgtatca aaatatatgc
1501 accgcacgct ccaagataaa agtgcacgtc agcacgtgtg atcgcccttc attgtgttct
1561 ttctatggaa gaaaacgttg caagaagtag gtattccgca ggaaaattaa tatcttaaga
1621 acaacaaaaa tgatattttc tagataaaac attgaaagag gaagtaagca gtgaaaacga
1681 tgctttaga tagtttcaac tgttttaacc ataaattaat ctagttagtc gtacgcaaaa
1741 gcatcaagca aaagcttgca aatgaagtct cgaaatgttt ggtgaccatg catgtcagtt
1801 agctagetgc atctttttac aaagtcagaa ggtttaacta acgacctaca agtagctagc
1861 taggccagtg tctctttctc cagtgtcatg catgctaata acctagaaag ttttcttctt
1921 tcttctctct cttccctgca tgcaaagctg tgcatgcatg tctcgacagt gtcgccctag
1981 cactgtagac acgagcccta ccaacttaatt ggtggtttgt tccctgatta attcgggtgca
2041 actactgctg aaccacccgt cgctaaccat ctttttcttc ttcctttggt ccgcatcttg
2101 acgttttttc agcgatggac gatcggatcc ggccagtcca gtggtcctac tcgtttcagc
2161 tagccactgt tccattcttt taagcttaac gaagacgatt acaccagctg ctacttagcc
2221 agtaactata actcaactgc agcctttgtg tagtcatcat atcgactttg aaagtgcac
2281 cgggtggatcc atggtacatg acgccatcga tcaccaggca ctaactaacc atgcataacc
2341 cagggtgttg ttctgttggc ctttccaagt ttggtctgcc tgaaaagaat tgtgatataa
2401 taggattgta ggttagtgta gtggtactag ctagtagttg gcacttgatc ggccggggcag
2461 caagttaaga agaggattaa gttgcgtgta cttatatgga gtactttgtc atgcacgtga
2521 gctagaccgt ttattggagc ttagctggga gcagccggag gcatgcatgc acgccatggc
2581 gatccacatc gatcgtatgt ggactatcca acggccgtgc tgcggacgtt ggaccagaaa
2641 ctttggtttg tcttagcatg tatgtatgca tgaggtctct acacccccct gtatttctag
2701 gcttctctgc aattgccatc tacgtgtggt cgacctccat tctgccctta cgatattcct
2761 ggcccgttta gtttaataaa tccagctagc tagtgccgtg caagtactac acaatttatg
2821 ccataccatt gattggcgat ggactcttta agtgtacacg tactgaaaaa tacatgtatt
2881 ctttctagca taattgatgt accaactatc aagtgtaca ctttaataga gtagattggt

```

〔 図 3 〕

2941 gtagagttag ttggtaaacc aagcaaatca gggagggtaa aagattcact gcactggatg
 3001 ctagtcaaag ttcattcctt cctttaaggt tatctagttc ctttttctcc ttgctcgtgg
 3061 tagagtagct agtagctagt gacaagtcgg tcaaggcgcc ggccgtgaaa atagcaatgt
 3121 tcctcggccg tgtgcgtgca tctgacacca actcgtgact gtaaaaaaaaa caatatattaa
 3181 gtggtgcatc agccaccaa ctatatagag agaaagagat aaaaaaatgt gcaaaactag
 3241 ttagctagag gcttacacat atgcatccat gcatgctaca acatttcagt taaacgtcct
 3301 tggcggggag ttagtattat ccctgcgcaa cagggtcaaaa ggctctgtgt gcatgtgtgt
 3361 tcatgcatcg ccgccattct tgcttattgg tttctttttt atattccatc acatgccatc
 3421 atgggataat tttttaattt tctactatgg catggaacag tgctactact ctacctggtg
 3481 caaataattg attttgtgaa ggttaactaa ccgaggttat attacatgac aggcgtggag
 3541 tccatcgggg tgtgctacgg catgagcgcc aacaatctgc cggcggcgag caccgtggtc
 3601 aacatgttca agtccaacgg gatcaactcc atgcggctgt acgctccga ccaggcggcg
 3661 ctgcaggcgg toggcggcac gggcgtgaac gttgttgtgg gcgcgccaa cgacgtgctc
 3721 tccaacctcg ccgccagtcc cgcagcggct gcatcgtggg tgaggagcaa catccaggcg
 3781 taccccaagg tctccttcg gtatgtctgc gtgggcaacg aggtcgccgg cggcgccacc
 3841 cagaaccttg tccccgccat gaagaacgtg caggcgcgcc tgccctccgc cgggctgggc
 3901 cacatcaagg tgaccacgtc ggtgtgcgag gccatcctgg ggggtgtacag ccgcgcgtcc
 3961 gccgggtcct tcaccggaga ggcggacgcg ttcattgggccc ccgtgggtgca gttccttgcc
 4021 cgcaccggcg cgcgcgtcat ggccaacatc taccgtacc tggcctgggc ctacaaccgc
 4081 agcgccatgg acatgagcta cgcgtcttc accgcctccg gcaccgtggt ccaggacggc
 4141 tcctacgggt accagaacct gttcgacacc accgtggacg ctttctacac ggccatggcc
 4201 aagcacggcg gctccaacgt gaagctggtg gtgtccgaga gcgggtggcc gtcagccggc
 4261 ggcaacggcg cgaccccgcc caacgccagg atctacaacc agtacctcat caaccacgtc
 4321 gggcgcgcca cccccgcca cccggcgccc atcgagacct acgtcttctc catgttcaac
 4381 gagaaccaga aggacaacgg cgtggagcag aactgggggc ttttctaccc caacatgcag
 4441 cacgtctacc ccatcagctt ctgatgaggt agcagctacc tagtgccgt atgtccgtac
 4501 gtacgcgcgc gcgtataaga gcgtgtacgc cgtacgtatg cgcacattat gtattgtaca
 4561 gggcttgggt tgggaacttg ggatgcgacc gctgaggcag ctcagatcgt acgcgagtag
 4621 tggtttgcta tactagtgtg ccagtacgta tgattttcga tgggaaggga gcatatgcaa
 4681 acgctcccc ttcctcgatt gatcatgcac ttgatacgt caccgatgtg tgcgtaccta
 4741 ggaactatat ttaggggttc aaaatttcgt caaaacttga cgaaatttgt ccaaaataat
 4801 aaagtatgaa atatatcgcc gaagaccgaa tattcctata tataatttt

〔図 5〕

MWG943

Dr. G. Kuenzelよりの私信(personal communication)に
より塩基配列情報を入手

Comments: CLONE MWG943; INSERT SIZE: 1.8 kb

'.....' IDENTIFIES A GAP OF UNKNOWN SIZE

```
1 accggtgatcgaccagaatttctactacgtggggctgaagtacaccggcc
51 cgacgttcgcctgcgccatgagcaacatcctcccggcgatgaccttcgtc
101 atggcggatgatcttcaggtgcaatttcgttaccagtttactttatttgc
151 tacgggtgcgacacacatatatgcatacatgcgtacgtgtggaacgagaga
201 aaccggtgcctgacgtttttgcatgctgtttgattgtgattgacatacagg
251 atggagaagatagagctgacgaagctgcggtgccaggccaagatcttcgg
301 gacggtcgtgacagtggccggcgcatgctgatgacgctctacaagggcc
351 cgctcatgcacctgccatggaccaacagccacgcgcagcccgggcgc...
401 ..gctacacttatttgcactagtatacttatgtcatctcggagagtgat
451 gtgatttgcctttccactttacctctctaataatagtaagtaaccagcaaa
501 gaccctgtgtatcaataatgttatgagattccaagcagctttattactac
551 tcccttcgtaaagaaatattgttatgagattcctgacttttagtgatctat
601 aaacgtttttaatttacttacagagggagtactagcaggcaaccgaaaa
651 gctttgttgatctatcaattcttgcctgcatgtatctaattgacatcca
701 acgtttcatatggaattgtttgcaattttgttgatagcttacctggcata
751 caacttggtcgtttcatatagaattgacaaaaactatattctctatttct
801 tgaaaagggtcctcaaaaaatttggaacacctatccatgaggtgcctga
851 aaaaacgttttgctttgtcactttctttcccatccatgagatctcgatca
901 gacatccaacagctctcatcccttctttctattcaagatgagagttgcct
951 atatcttgctccttgcgctgctgctctccaacctcgtcgaaccgacggc
1001 ctccaccc
```

Number of bases is: 1003.

【図 6】

Jrg12

LOCUS HVU43495 779 bp mRNA PLN 09-F

EB-1996

DEFINITION Hordeum vulgare jasmonate-induced mRNA, partial 3' sequence.

ACCESSION U43495

KEYWORDS .

SOURCE barley.

REFERENCE 1 (bases 1 to 779)

AUTHORS Lee, J. E., Parthier, B. and Loebler, M.

TITLE Jasmonate signalling can be uncoupled from ABA signalling in barley: Identification of jasmonate-regulated transcripts which are

not induced by ABA

JOURNAL Planta 199: 625-632 (1996)

1 gagaactagt tctctctctc tctctctctg ccacagcctc ggcgcgtcga tcgccaccct
 61 gaacgccgtt gacatggtgt ctagcggcat caacaagccc gaaggcgcca ccaaatcctt
 121 ccccgtaga gccatcgtgt tcgcgagccc ccacgtcggg tgccgcttct tcaggtcggc
 181 gttccactcg tttccagacc tcaaggcgct gcatgtgcag aacgttggcg acgtcgtgcc
 241 cctgtaccca cctctggggg acgtggacgt ggccgtgcag ctgaccataa cgacaatccg
 301 gtccgcgtac ctgcgtgtgc cggccacgtg gggacgctcc acaacctcga gtgctacctg
 361 caoggggttg cgggggagca gggcagtgcc ggaggggttca agctcgaggt ggaccgtgac
 421 atagcgctgg tgaacaaggg tgccgatgcg ctgcgggacg agcaccgggt gccggcgagc
 481 tgggtgggtgc cgaagcacia gttcatggtc aaggggggag atgggggatg gacgtccag
 541 gacttcaagc acatctaagt taagttactc gcatcggcca ttcactagga ggagagtggg
 601 cgttgatgtg attcacggcg ctgtgctcgt tgccaagacc gaggttctaa ataacggctt
 661 acggtttgtc gaccgttcct agtatatttc ccattttatg caaaataagt gaatgtttcc
 721 aacaatatac actatgcatg agcgacacat gaatatgatg gaaacacttc tcctcgaca

〔 図 7 〕

Hor3

LOCUS HVDNAHOR3 1859 bp DNA PLN

25-APR-1996

DEFINITION H. vulgare Hor3 gene.

ACCESSION X84368

KEYWORDS D hordein; Hor3 gene.

SOURCE barley.

REFERENCE 1

AUTHORS Sorensen, M. B., Muller, M., Skerriitt, J. and Simpson, D.

TITLE Hordein promoter methylation and transcriptional activity in wild type and mutant barley endosperm.

JOURNAL Mol. Gen. Genet. 250, 750-760(1996)

```

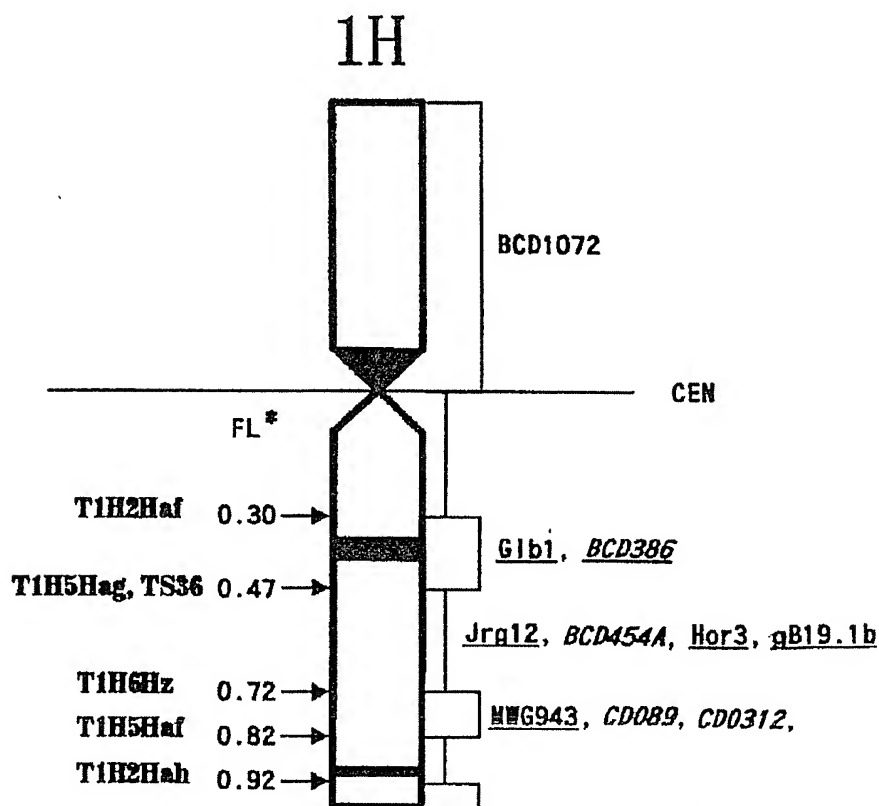
1  ctctgagtgc ccgccgattt gccagcaatg gctaacagac acatattctg ccaaaacccc
61  agaacaataa tcactttctg tagatgaaga gaacagacca agatacaaac gtccacgctt
121 cagcaaacag taccocagaa ctaggattaa gccgattacg cggcttttagc agacogtcca
181 aaaaaactgt tttgcaaagc tccaattcct ccttgcttat ccaatttctt ttgtgttgge
241 aaactgcact tgtccaaccg attttgttct tcccggtgtt cttcttaggc taactaacac
301 agccgtgcac atagccatgg tccggaatct tcacctcgtc cctataaaag ccagccaat
361 ctccacaate tcatcatcac cgagaacacc gagaaccaca aaactagaga tcaattcatt
421 gacagtccac cgagatggct aagcggctgg tcctctttgt ggcggtaatc gtcgccctcg
481 tggctctcac caccgtgaa cgtgagatca atgggaacaa cattttcctt gatagccgct
541 ctaggcagct acagtgtgag cgcgagctcc aggagagctc gctcgaggcg tgccggcggg
601 tcgtggacca acagctggtt ggccagctgc catggagcac ggggctccag atgcagtgt
661 gccagcagct tcgggacgtc agcccogagt gccgcccgt cgcctcagc caggctcgtga
721 ggcaatacga gcagcaaacc gaggtgccat ccaagggagg atccttctac ccgggcggga
781 ccgcaccgcc gctgcagcaa ggagatggt ggggaacctc tgtaaatgg aactaccag
841 accaaacttc ttcgcaacag tcatggcaag ggcaacaagg gtaccacca agcgttaact
901 cttcccagca gccaggacaa gggcagcaag ggtcctacct aggttcaact ttcccgcagc
961 agccaggaca aggacaacaa ccaggacaga ggcagccatg gtcctatcca agtgcaactt
1021 tcccacaaca gccagggcaa gggcaagggc aacaagggtg ctaccaggc gcaacttccc

```


【図8】

1081 tgctgcagcc aggacaaggg caacaagggc cctaccagag tgcaacttct ccacagcagc
 1141 caggacaagg acagggacaa caagagacct atccaattgc aacttccccg catcagccag
 1201 gacaatggca acaaccagga caagggcaac aagggtacta cccaagtgtg acttctccac
 1261 aacagtggg acaagggcaa caaggggtacc caagtacaac ttctccacaa caatcggggc
 1321 aagggaaca gctgggacaa gggcaacaac caggacaagg gcaacaaggg tacccaagt
 1381 caacttttcc acaacagcca ggacaatggc aacaagggtc ctaccaagt acaacttctc
 1441 cgcagcagtc aggacaaggg caacaagggt acaaccaag tggaacttct acgcagcagt
 1501 cgggacaagt gcatcagttg ggacaagggc aacaagggtg ctaccaatt gcaacttctc
 1561 cgcagcagcc aggacaaggg caacagctag gacaagggca acaaccagga catgggcaac
 1621 agctagtgcagggaacaa caaggacaag ggcaacaagg aactaccca agtatgactt
 1681 ctccgcacca aacaggacaa gggcaaaaag gatactacc aagtgcatt tctccgcagc
 1741 agtcaggaca aggacaacaa ggataccagc ctagtggagc ttcttcacag gggtcgggtc
 1801 aaggggcgtg ccagcacagc acatcttctc cgcagcagca agcacaaggg tgccaagct

【図11】



斜体：制限酵素処理で多型。

[図 9]

gB19. 1b

LOCUS HVGB191B 1295 bp DNA PLN

06-DEC-1995

DEFINITION H. vulgare (cv Bomi) gB19. 1b gene.

ACCESSION X77157

KEYWORDS group 1 Lea protein.

SOURCE barley.

REFERENCE 3 (bases 1 to 1295)

AUTHORS Stacy, R. A. P., Espelund, M., Saeboe-Larssen, S., Hollung, K., Helliesen, E. and Jakobsen, K. S.

TITLE Evolution of the Group 1 late embryogenesis abundant (lea) genes.

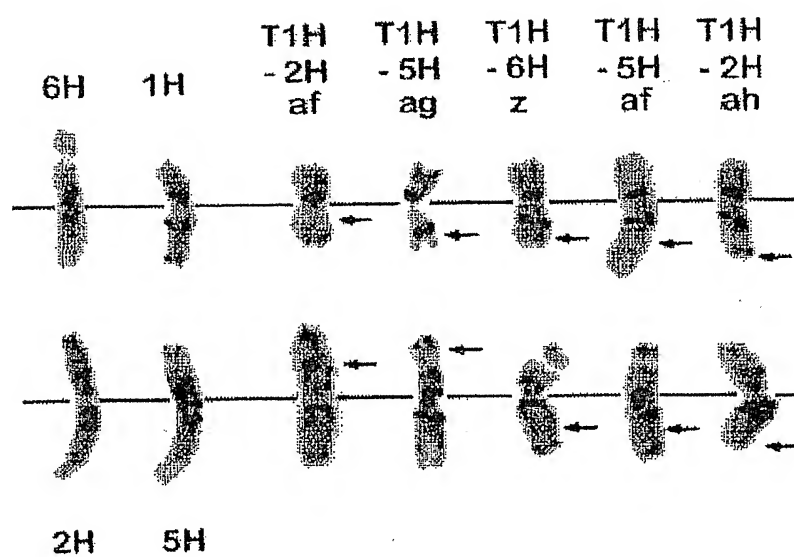
JOURNAL Plant Mol. Biol. 28, 1039-1054(1995)

```

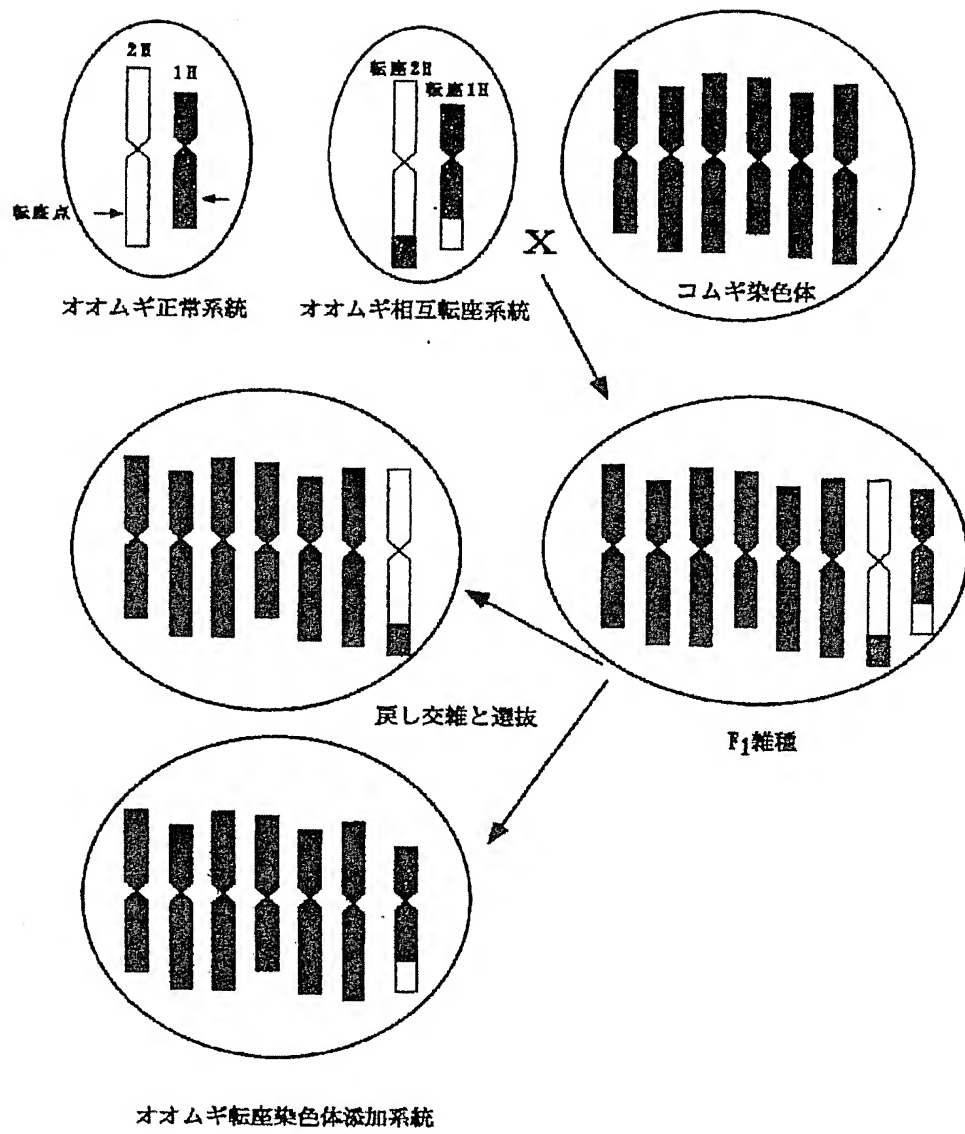
1 agcggccatg gacgtgacga cggagccggc tgaaccctag cgaatgggat aaaaatcgga
61 cctaaaatcc actgaaattg atatcgaaaa tgcctcgaa tatttgagag ggaaaccgct
121 gacaagtctg aaaattttcc cctccgaaaa attcccttca gggctctgata taatacacct
181 gaagtctata tattgtatcg gatctagccg tcgaattcgc ttcgacggac ggtccatatac
241 gtccggatgt accgtaaaac atctcaatta agagtggttt tgtacatcat tgatgatgaa
301 gaggatgaaa gaaagaaaaa gcagtacaat gctcgaccca tgcctggttt ccccgaccgg
361 ccgacgacga acgcacgtac gggagtgatt agtgetgtag ttcagtagta cgtatacgat
421 cccacgcgcc cacaggacga cagtgccaaag acaacgcagg tgtgtacgt agggctctat
481 agctctctag cgcattccgg tggctgcctc ggataagcac gctccgacgt gtcatecgtc
541 cggcgctcgc cctgacgcgg tgtcaatgca tcaggacagc aacagccgag gcttgcatcc
601 gcgtcgtcgg acacgcgcgc tctcctggcc cgcgacgcgc ctctcgcgc gctataaaag
661 ggcgacgtcg ctgcctcctc catcaccagc atcaaacaaat caactacaac aaccgtacca
721 agctgaagca gcacagcaca cacgtttcct tccagctgag gttaaagtag ccaggccagc
781 ccaggcagaa agagagtgat ggcttcgggt cagcaggaga ggtcgcagct ggaccgcaag
841 gcccgcgagg gtgagaccgt cgtccccggc ggcaccgggt ggaagagcct cgaggcgcac
901 gataacctcg ccgaaggtag gtgcatgcgc gagaaatgtc gatgtactga ttgcttgagc
961 gatctgtgac ctccatact gattgctagc attgctctat gctgcatttg tgcaggcgcc

```

【図12】

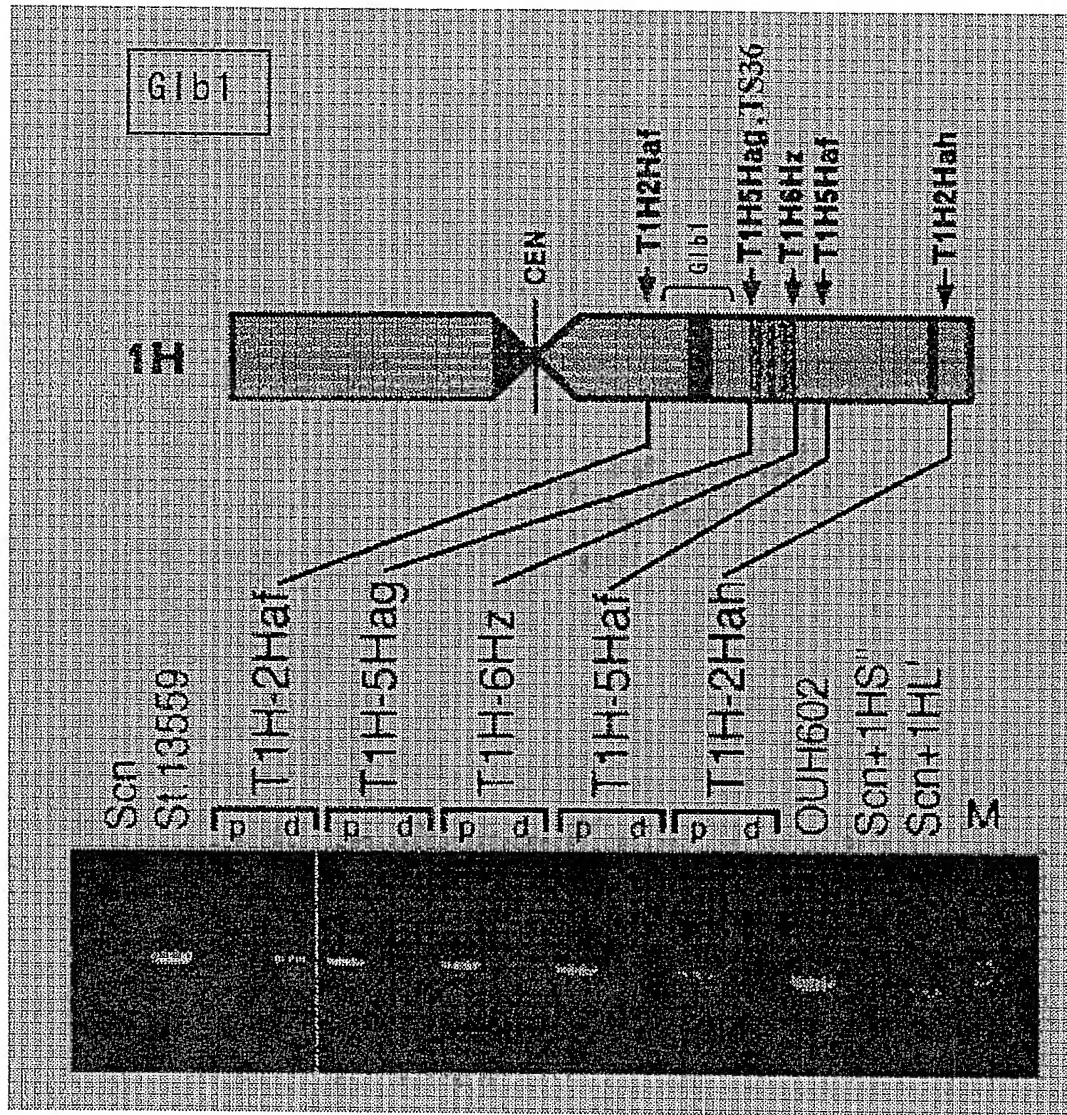


【図13】



[illegible]

【図15】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 BA11 BA13 BB35 BB50 BB52
 CB20 DA12 DA13 FB05
 4B024 AA11 CA01 CA09 HA12
 4B063 QA01 QA18 QQ04 QQ42 QR08
 QR32 QR42 QR62 QS25 QS36
 QX02